

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/547

G01N 33/533

G01N 33/52



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410028106.9

[43] 公开日 2005 年 5 月 11 日

[11] 公开号 CN 1614421A

[22] 申请日 2004.7.16

[21] 申请号 200410028106.9

[71] 申请人 深圳大学

地址 518060 广东省深圳市南山区南油大道  
2336 号

[72] 发明人 刘志刚 邢苗 喻海琼 吉坤美  
高波

权利要求书 2 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 一种诊断过敏性疾病变应原的检验方法

[57] 摘要

本发明涉及一种新型诊断过敏性疾病变应原的检验方法。通过天然或重组的方法获得尘螨、真菌和花粉等变应原，并包被在磁性纳米粒子。包被蛋白 A 的磁性纳米粒子与待测病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗体-抗原-酶标记抗体复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 做化学发光剂，AMPPD 在碱性磷酸酶的催化作用下去磷酸并生产中介体 AMPD，AMPD 分解发射光子。通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。血清特异性 IgE 超过 100IU/ml 的即认为该变应原反应为阳性。

ISSN 1008-4274

1、一种新型的诊断过敏性疾病变应原的检验方法。包括以下步骤：制备纳米磁性粒子。通过天然或基因工程方法获得尘螨、真菌和花粉等变应原，进行蛋白含量测定，包被磁性纳米粒子。另外，制备用蛋白质 A 包被的磁性纳米粒子。包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与待测病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被特异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的抗体，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记二抗复合物。经洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，AMPPD 在碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产不稳定的中间体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳定态，同时发射光子，这种发光稳定、持续时间可长达 1 小时。通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。

2、根据权利要求 1 所述的用纳米磁性粒子酶联免疫检测的方法，其特征在于用天然或重组尘螨变应原包被纳米磁性粒子及用于检测过敏病人特异性 IgE 抗体。

3、根据权利要求 1 所述的用纳米磁性粒子酶联免疫检测的方法，其特征在于用天然或重组真菌变应原包被纳米磁性粒子及用于检测过敏病人特异性 IgE 抗体。

4、根据权利要求 1 所述的用纳米磁性粒子酶联免疫检测的方法，

---

其特征在于用天然或重组花粉变应原包被纳米磁性粒子及用于检测过敏病人特异性 IgE 抗体。

5、根据权利要求 1 所述的用纳米磁性粒子酶联免疫检测的方法，其特征在于用其他天然或重组变应原包被纳米磁性粒子及用于检测过敏病人特异性 IgE 抗体。

## 一种诊断过敏性疾病变应原的检验方法

### 技术领域

本发明涉及免疫诊断领域，具体的说是一种运用纳米免疫磁珠 (IMB) 即包被有变应原的磁性微球快速诊断过敏性疾病过敏原的方法。

### 背景技术

过敏性疾病（如哮喘、过敏性鼻炎等）是临床上的常见病、多发病，据 2000 年 WHO/IAACI 报告指出近些年来哮喘的发病率和死亡率呈上升趋势。全国部分城市对青少年哮喘流行病学统计（ISSAC 调查）哮喘发病率为 3.3%-5.1%，远较 10 年前（约 1%）升高；目前全国至少有一千万以上儿童患哮喘。

过敏性疾病是由于各种接触或吸入变应原引起的，变应原大部分为蛋白质，也可多肽或糖类以及人工合成的物质如药物等。变应原种类很多，多达数百种，国内常见的大约有 40-60 种。最常见的变应原有尘螨、花粉和真菌等。在发生过敏的病人血液中会产生针对该过敏物质的抗体，如速发型过敏反应会产生针对该过敏物质免疫球蛋白 E (IgE)。通过酶标的方法能够测定该 IgE，从而找到相对应的过敏原。检查过敏原的目的是为了找出过敏的原因。比如酶标检测到过敏患者血清中有针对牛奶的抗体 IgE，就表明该患者对牛

奶有过敏的可能。诊断出特异性的变应原对避免接触变应原及展特异性免疫治疗是很重要的。

随免疫学的不断发展,运用各种新的免疫技术,如化学发光技术、时间分辨荧光免疫测定技术、荧光偏振免疫分析测定技术等进行自动化免疫分析的仪器不断涌现。它们不仅提高了工作人员的效率,还大大提高了检测的准确度和灵敏度,其中有的灵敏度可达 ng 甚至 pg 级水平。

纳米磁性粒子酶免疫测定技术是新型、高效、灵敏、安全的免疫检测技术,它结合了纳米磁性粒子和酶免疫化学发光技术,灵敏度高于传统酶标 ELISA 法,达到放射性免疫检测法的灵敏度,且无放射性污染,操作简单快捷,具有特异性高等优点。因此,研制出变应原检测用的纳米磁性粒子对变态反应性疾病的诊断和治疗是很有价值。

## 发明内容

本发明目的即在于提供一种快速、廉价和特异的诊断过敏性疾病变应原纳米磁珠酶免疫化学发光分析法。

本发明采用包被变应原的纳米磁性粒子,它具有体积小、浓度高、结合面积大和造价低廉的特点,可大量、特异性地结合病人血清中的 IgE 抗体,分离简单、快速,操作方便。

本发明采用了纳米磁性粒子酶免疫分析技术原理。先以包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与待测病人血清孵育后,血清中的 IgG 被特

异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的抗体，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记二抗复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，AMPPD 在碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产中介体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳定态，同时发射光子，这种发光稳定、持续时间可长达 1 小时。通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。

本发明首次采用天然或重组变应原进行磁性粒子包被。变应原可以是来自以下物质的变应原：屋尘螨，例如 *Dermatophagoides farinae* 或屋尘螨；真菌（例如链格孢属、曲霉属、枝孢属和青霉属）；树花粉，例如桦树白桦树、桤木、榛树、橡树、柳树、悬铃木、山毛榉、榆树、枫木、岑树和鹅耳枥的花粉；草花粉，例如蒿、梯牧草、六月禾、早熟禾、黑麦草、果园草鸭茅、豚草、甜春草、黄花茅和黑麦的花粉；猫、狗或马的皮屑；昆虫（例如蟑螂）；或虾、蟹、牛奶等食物。

本发明提供了一种新型的过敏性疾病检测方法，采用包被变应原的纳米磁性粒子，生产工艺简单、成本低廉、具有高特异性和灵敏性等优点。

本发明包括以下步骤：制备磁性纳米粒子。通过天然或基因工程方法获得尘螨、真菌和花粉等变应原，进行蛋白质含量测定，包被磁性纳米粒子。另外，制备用蛋白质 A 包被的纳米磁性粒子。选

用对特异性变应原过敏病人血清进行鉴定。包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被特异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记二抗复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产中介体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳定态，同时发射光子，通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。血清特异性 IgE 超过 100IU/ml 的即认为该变应原反应阳性。

### 具体实施方式

本发明的内容，通过以下的实施例作具体说明：

#### 实施例 1：

##### 屋尘螨天然变应原的制备

屋尘螨收集自深圳大学师范学院附中宿舍，并在深圳大学生命科学学院进行纯培养获得。

收集屋尘螨，称量去脂材料，按 1：5 比例（1g 屋尘加入 5ml 提取液）加入碳酸氢钠-盐水提取液，提取 72 小时。每天在振荡器上振荡 2 小时，其余时间放入冰箱提取。

提取完成后，先用多层纱布过滤，弃去沉淀物，再用布氏漏斗加多层滤纸减压过滤，澄清液体。记录滤液量，放入透囊中透析 24 小时。使用碳酸氢钠-盐水提取液作为透析用液，每 6 小时更换一次。

透析完毕，再称量滤液，如因盐析作用多出原量或少于原量，进行浓缩或稀释，使之保持原量。校正溶液 pH 值，使之保持在 7。

在严格无菌操作下，将消毒蔡氏滤器安装于消毒滤瓶上，用蒸馏水打湿滤板，倒入屋尘溶液。15 分钟后接通真空泵，使滤液穿过滤材滴入滤瓶，于无菌下分装于瓶中。贴好标签，打上批号，放入 4-6℃ 冰箱储备待用。

### 实施例 2:

#### 花粉天然变应原的制备

蒿和豚草等植物于开花期去野外剪回花枝，插入装满水的容器内(清水应每天更换，以防止枝条腐烂)，下面铺以白纸，每日轻轻敲打花枝，花粉则随开随落于纸上。

收集去脂材料，按 1: 25 加入碳酸氢钠-盐水提取液。在冰箱里提取 72 小时，每天振荡或搅拌 2 小时。

用常压或减压过滤，澄清液体，并测定和校正 pH 值至 7。

其余步骤与屋尘螨变应原制备。

### 实施例 3:

#### 真菌天然变应原的制备

用曝皿法从空气中收集菌种。

菌种的分离鉴定。

配置固体培养基，制作带有培养基的无菌皿碟和斜面培养管。于室外空气中打开皿盖，曝露 3 分钟左右，取回实验室，在室温下(或温箱中)静置。几天后，落进皿碟中的真菌孢子即发芽生长，并形成菌

落。于酒精灯下，挑取培养物制成临时压片，在显微镜下进行鉴定，并将所需要的菌株移至培养管斜面上，保存纯菌种。

用液体培养基接种培养，培养天数视培养物生长快慢而定。液体培养基的配制方法详见叶世泰主编的《变态反应学》（1998年，科学出版社）。

收集菌毯，用冷水轻轻洗净上面的残留培养基。控去水分，加入95%酒精浸泡1小时灭活。室温下自然干燥，用组织打碎机粉碎。去脂、干燥。

称量去脂材料，按1:25加入碳酸氢钠-盐水提取液。在冰箱里提取72小时，每天振荡或搅拌2小时。

用常压或减压过滤，澄清液体，并测定和校正pH值至7。

#### 实施例4

##### 纳米磁性粒子的制备和性质分析

Fe(III)和Fe(II)(0.5M:0.5M)混合，即 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶于在脱气的蒸馏水中，将20% (w/v)多聚物(Dextran或PVA)水溶液等体积与铁溶液混合，60℃水浴15分钟。1M氨水溶液以等体积逐滴滴入铁多聚物混合溶液，以保持pH在11.5，60℃加热15分钟，并剧烈搅拌，将悬液对水(pH6.5)透析(Sigma透析袋，分子量限制为12400)，12000g离心20分钟，收集上清，冷冻干燥。

将冻干粒子溶于浓盐酸，用原子吸收光谱分析Fe含量。TEM分析粒子大小。

纳米粒子1 $\mu\text{g}$ 溶于1ml蒸馏水，与100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  (终浓度)的蛋白A

共赋育，以制备蛋白 A 包被的纳米粒子。

### 实施例 5

尘螨变应原包被纳米粒子用过敏病人血清进行鉴定。包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被特异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记二抗复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产中介体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳定态，同时发射光子，通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。10 份经皮试测试阳性的尘螨过敏病人血清特异性 IgE 抗体浓度范围为 150-300IU/ml，10 份阴性血清抗体浓度范围为 10-48IU/ml。为此采用 100 IU/ml 作为诊断对该变应原反应阳性的标准。如低于 100IU/ml 的即为阴性。

### 实施例 6

花粉变应原包被纳米粒子用过敏病人血清进行鉴定。包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被特异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记抗体复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产中介体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳

定态，同时发射光子，通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。10份经皮试测试阳性的花粉过敏病人血清特异性 IgE 抗体浓度范围为 150-300IU/ml，10份阴性血清抗体浓度范围为 10-47IU/ml。为此采用 100 IU/ml 作为诊断对该变应原反应阳性的标准。如低于 100IU/ml 的即为阴性。

### 实施例 7

真菌变应原包被纳米粒子用过敏病人血清进行鉴定。包被蛋白质 A 的磁性纳米粒子与病人血清孵育后，血清中的大部分 IgG 被特异性的去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中 IgE 与变应原特异性地结合，在加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗原-抗体-酶标记抗体复合物。洗涤、分离后加入底物 AMPPD 作为化学发光剂，碱性磷酸酶的催化作用下，迅速去磷酸，生产中介体 AMPD。AMPD 很快分解，从高能激发状态，回到低能量的稳定态，同时发射光子，通过光量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。10份经皮试测试阳性的真菌过敏病人血清特异性 IgE 抗体浓度范围为 140-310IU/ml，10份阴性血清抗体浓度范围为 10-45IU/ml。为此采用 100 IU/ml 作为诊断对该变应原反应阳性的标准。如低于 100IU/ml 的即为阴性。

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种诊断过敏性疾病变应原的检验方法                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1614421A</a>                     | 公开(公告)日 | 2005-05-11 |
| 申请号            | CN200410028106.9                               | 申请日     | 2004-07-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳大学   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 深圳大学   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 深圳大学   |         |            |
| [标]发明人         | 刘志刚<br>邢苗<br>喻海琼<br>吉坤美<br>高波                  |         |            |
| 发明人            | 刘志刚<br>邢苗<br>喻海琼<br>吉坤美<br>高波                  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/52 G01N33/533 G01N33/547                |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明涉及一种新型诊断过敏性疾病变应原的检验方法。通过天然或重组的方法获得尘螨、真菌和花粉等变应原，并包被在磁性纳米粒子。包被蛋白A的磁性纳米粒子与待测病人血清孵育后，血清中的大部分IgG被去除。再将血清加入包被有变应原的磁性纳米粒子，血清中IgE与变应原特异性地结合，加入碱性磷酸酶标记的二抗，经温育后形成固相包被抗体-抗原-酶标记抗体复合物。洗涤、分离后加入底物AMPPD做化学发光剂，AMPPD在碱性磷酸酶的催化作用下去磷酸并生产中介体AMPD，AMPD分解发射光子。通过光子量子阅读系统记录发光强度，并从标准曲线上计算出待测抗体的浓度。血清特异性IgE超过100IU/ml的即认为该变应原反应为阳性。